

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ATIVOS DE PLANTAS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Oselys Rodriguez Justo e Ângela Maria Moraes

Departamento de Processos Biotecnológicos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, CP 6066, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Gisela Pizarro de Mattos Barreto e Adriana Zerlotti Mercadante

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, CP 6121, 13083-862 Campinas – SP, Brasil

Paulo de Tarso Vieira e Rosa*

Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, CP 6154, 13084-862 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 23/10/07; aceito em 30/4/08; publicado na web em 19/9/08

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PLANT EXTRACTS OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION. The aim of this work was to evaluate the antioxidant properties of ginger and rosemary extracts, obtained by supercritical extraction. The extracts were characterized by HPLC, GC-MS, phenolic compounds content and antioxidant activity. The main active compounds were identified and high content of phenolic compounds was observed. The extracts presented high antioxidant activity against the free radicals ABTS^{•+} (350 and 200 mM Trolox/g, for ginger and rosemary, respectively) and DPPH[•] (145 and 80 mM Trolox/g, for ginger and rosemary, respectively). These results suggested that the attained extracts are potential substitutes of synthetic antioxidants used in chemical, food and pharmaceutical industries.

Keywords: active plant extracts; supercritical fluid extraction; antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

Os recursos naturais continuam sendo importantes fontes de substâncias e precursores com grande potencial terapêutico, não apenas pelo grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos primários e secundários por elas sintetizados. Uma porcentagem considerável da população que vive em países em desenvolvimento faz uso da medicina tradicional, incluindo as plantas medicinais nos cuidados primários da saúde.¹

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos, através da triagem de fontes naturais, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente e que desempenham um importante papel no tratamento de várias doenças. Especificamente na terapia de enfermidades infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 75 e 60%, respectivamente, dos fármacos atualmente empregados são derivados de fontes naturais,^{2,3} sendo muito deles compostos com atividade antioxidante que podem agir em diversos níveis da seqüência oxidativa nos sistemas biológicos.^{4,5}

A família Labiatae compreende 150 gêneros com aproximadamente 3500 espécies, nativas principalmente do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, Sudoeste da Ásia e América do Sul. As principais espécies desta família são o alecrim, a sálvia, o orégano, o tomilho, o manjeriço, a manjerona e a menta. Dentre estas espécies, os extratos ativos de alecrim e sálvia têm sido os mais estudados nos últimos anos. Antropologistas e arqueologistas têm encontrado evidências do uso do alecrim como planta medicinal desde a época do Egito antigo.⁶

As propriedades antioxidantes dos extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* Labiatae) têm recebido considerável atenção nos

últimos anos. Na indústria de alimentos, seus efeitos antioxidativos têm se mostrado superiores aos do antioxidante sintético BHA e semelhantes aos do BHT. Comercialmente, tem sido usado em combinação com tocoferóis, observando-se sinergismo entre o alecrim e o α -tocoferol (o extrato de alecrim regenera o tocoferol). O alecrim também tem demonstrado efeito sinérgico com o ácido cítrico e com o antioxidante BHA.⁷

O potencial terapêutico dos extratos de alecrim e de seus principais componentes tem sido pesquisada por vários grupos de pesquisa. Entre as principais atividades biológicas dos extratos orgânicos de alecrim destacam-se os efeitos antimicrobiano,⁸⁻¹⁰ antibacteriano,^{6,9,11} anti-reumático,^{6,12} antiinflamatório,^{6,13} anticarcinogênico e antimutagênico,¹⁴ antiangiogênico,¹⁵ hepatoprotetor, diurético, mucolítico, anticonvulsivo e estimulante,¹⁶ antitumoral¹⁷ e antioxidante.^{6,11,18-20}

A atividade antioxidante dos extratos de alecrim é atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos, voláteis e não voláteis, como os flavonóides, os ácidos fenólicos e os diterpenos fenólicos,^{21,22} tais como o ácido carnósico e o carnosol (hidrofóbicos) e o ácido rosmarínico e o rosmanol (hidrofilicos),²⁰ sendo que mais de 90% desta atividade é atribuída aos compostos hidrofóbicos, principalmente ao ácido carnósico¹⁹ (Figura 1). Contudo, este ácido é bastante instável e sua degradação leva à formação de carnosol (metil éster do ácido carnósico), que se degrada, por sua vez, em rosmanol, epirosmanol e 7-metilrosmanol.^{23,24}

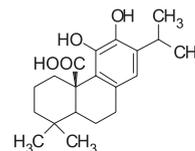


Figura 1. Estrutura química do ácido carnósico, principal composto antioxidante dos extratos ativos de alecrim

*e-mail: paulorosa@iqm.unicamp.br

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) pertence à família Zingiberaceae, a qual se distribui amplamente na região sudoeste da Ásia e do Arquipélago Malaio, incluindo mais de 1200 espécies distribuídas em 53 gêneros. O gênero *Zingiber* inclui ainda aproximadamente 85 espécies.²⁵ As plantas desta família, em geral, apresentam grandes quantidades de ingredientes pungentes e no caso específico do gengibre, os compostos responsáveis pela pungência são principalmente os gingeróis. Estes compostos e em especial o 6-gingerol (Figura 2), são também os componentes mais ativos neste tipo de extrato.²⁶⁻²⁸

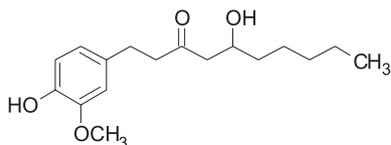


Figura 2. Estrutura química do principal composto ativo presente no extrato de gengibre (6-gingerol)

O gengibre é uma especiaria amplamente usada há vários séculos na medicina tradicional para aliviar sintomas como inflamação, doenças reumáticas e desconfortos gastrintestinais.²⁸⁻³⁰ Seus extratos e seus principais compostos pungentes, os gingeróis, têm mostrado recentemente variada atividade biológica, incluindo efeito como agentes antineoplásicos,^{26,31-40} antiespasmódicos e antieméticos,⁴¹ inibidores de enzimas,⁴² anti-hemorrágicos,⁴³ antifúngicos,⁴⁴ inibitórios da síntese de óxido nítrico,⁴⁵ protetores de células neurais,⁴⁶ anti-reumáticos,⁴⁷ microbicidas,¹⁰ anti-inflamatórios e antioxidantes.^{36,40,48-50}

De modo geral, os trabalhos presentes na literatura descrevem vários estudos relacionados com as principais atividades apresentadas pelos extratos ativos de alecrim e gengibre e seus principais compostos, mostrando que apesar dos mecanismos biológicos pelos quais os principais componentes dos extratos ativos destas plantas manifestam seus efeitos nos sistemas celulares não terem sido ainda completamente elucidados,^{28,30} existe um grande interesse na utilização deste tipo de compostos, principalmente do ponto de vista terapêutico.

A qualidade do extrato de plantas é muito influenciada pela metodologia de extração utilizada. Esta extração, a partir de produtos naturais, pode ser realizada por arraste a vapor, extração por solventes e, mais recentemente, por extração com fluidos supercríticos (EFSC).

Os óleos essenciais de plantas possuem alto valor agregado; entretanto, são compostos de uma mistura complexa de substâncias, muitas delas facilmente termodegradáveis. O fracionamento convencional de óleos essenciais em destiladores a vácuo pode levar à decomposição destes constituintes termolábeis, e o aquecimento prolongado em contato com a água pode conduzir à hidrólise de ésteres, polimerização de aldeídos ou à decomposição de outros compostos.

A extração por solventes tem como principais desvantagens o fato dos solventes clássicos serem geralmente pouco seletivos e sua eliminação aumentar os custos energéticos e os riscos de perda dos compostos voláteis.

As questões relacionadas ao desenvolvimento econômico e industrial através do uso de técnicas que evitem ou minimizem os danos ao meio ambiente têm sido bastante discutidas nos últimos anos. Processos que empregam como solvente de extração gases a altas pressões (sendo o dióxido de carbono o exemplo mais importante), ou fluidos pressurizados (como a água, usada em reações de hidrólise), são genericamente denominados de tecnologia supercrítica, e classificados como processos tecnológicos limpos.

As altas solubilidades, taxas de transferência de massa e seletividade fazem da extração por tecnologia de fluido supercrítico uma metodologia bastante atrativa. A seletividade do processo de extração depende principalmente da densidade do solvente supercrítico, a qual pode ser alterada pela variação das condições do processo. O baixo calor

latente de evaporação no processo e a alta volatilidade dos solventes permitem obter extratos ativos isentos de resíduos tóxicos e com uma qualidade final elevada quando comparados aos produtos obtidos por técnicas convencionais. Além disto, a extração levada a cabo a baixas temperaturas preserva os produtos termicamente degradáveis.⁵¹

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as propriedades antioxidantes de extratos ativos de alecrim e gengibre obtidos por extração com fluidos supercríticos, visando suas aplicações nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) orgânico foi obtido de duas diferentes fontes, o Instituto Agroflorestal Bernardo Hakvoort do Paraná e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em São Paulo, Brasil. O gengibre orgânico (*Zingiber officinale* R.) foi obtido da Fazenda Experimental Lageado da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu. O padrão de ácido carnósico (com pureza mínima de 93%) foi obtido da A.G. Scientific, Inc. (EUA). Os gases (CO₂ e hélio) utilizados foram obtidos da White Martins, Brasil (99,8% de pureza). Acetona, metanol, etanol e ácido fosfórico, todos grau p.a., foram obtidos da Synth (Brasil). Acetonitrila, grau CLAE, e o reagente de Folin-Ciocalteu foram obtidos da Merck (Alemanha). Os radicais ABTS⁺ e DPPH[•], ácido gálico, diazometano e persulfato de potássio foram obtidos da Sigma Chemical Company (EUA). Utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilromo-2-ácido carboxílico) da Aldrich Chemical Co. (EUA) como antioxidante de referência. A água utilizada foi destilada e purificada em sistema Milli-Q da Millipore (Brasil).

Métodos

Obtenção dos princípios ativos por extração com fluidos supercríticos (EFSC)

A extração supercrítica foi realizada em uma unidade Spe-ed SFE da Applied Separations modelo 7071 (Allentown, PA, EUA), consistindo de uma coluna de extração de aço inoxidável da TharDesigns (Pittsburg, EUA), que possui um volume de 3.10⁻⁴ m³, diâmetro interno de 0,0545 m e altura de 0,1286 m.

A coluna, empacotada com o material vegetal seco e moído, foi colocada no interior de um controlador de temperatura e, após atingir o equilíbrio térmico, foi pressurizada com CO₂ até atingir a pressão requerida. Uma vez atingido este valor, a válvula micrométrica na saída da coluna foi aberta, para admissão de CO₂ na vazão desejada. A extração foi mantida pelo tempo requerido, sendo os extratos coletados em frascos âmbar, purgados com hélio e mantidos a 0 °C para evitar a perda dos compostos voláteis. A extração supercrítica do gengibre foi realizada a uma pressão de 30 MPa, 30 °C de temperatura e 1,42.10⁻⁴ kg/s de vazão de CO₂.⁵² As extrações das amostras de alecrim foram realizadas a 25 MPa, 40 °C e 1,13.10⁻⁴ kg/s de vazão de CO₂.⁵³

A densidade aparente (ρ_a) do leito de partículas foi calculada usando-se o volume total da célula de extração e a massa total de alecrim necessária para empacotá-la. O rendimento das extrações foi determinado pela razão entre as massas de extratos e das matérias-primas utilizadas em cada extração, multiplicada por 100.

Caracterização dos extratos ativos por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM dos extratos de alecrim e gengibre foram realizadas em cromatógrafo gasoso (Varian Start, modelo 3600 CX) usando como detector um espectrômetro de massas (Varian-Saturn GC/MS/MS, modelo 2000), equipado com uma coluna Varian CPWax

58 FFAP-FS (25 m x 0,25 mm x 0,2 mm). A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. O gradiente de temperatura foi programado para manter uma temperatura inicial de 50 °C por 5 min, seguido de uma rampa de temperatura de 10 °C/min até 220 °C, mantendo o injetor e a interface em condições isotérmicas por 38 min. Hélio foi usado como gás de arraste, com um fluxo de 1 mL/min (8 psi).

As soluções dos extratos e do padrão de ácido carnósico, previamente derivatizados com diazometano (30 min a 0 °C) e dissolvidos em acetona (1 µL), foram injetadas manualmente em modo *split*, com divisão de fluxo de 1:100. A ionização foi realizada por impacto de elétrons com energia de fragmentação de 70 eV e temperatura de captura do íon de 170 °C. Os espectros de massas foram obtidos em uma faixa de 35 a 650 *m/z* a 1 ciclo/s. Os principais compostos antioxidantes dos extratos, 6-gingerol e ácido carnósico para o gengibre e o alecrim, respectivamente, foram identificados em função do tempo de retenção e suas correspondentes massas moleculares. Os resultados foram processados através do programa Varian WS versão 6 (MSWS, Varian, USA).

Caracterização dos extratos ativos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas usando um equipamento Waters 1525 com detector de arranjo de diodos (DAD 2487, Waters) e injetor Rheodyne com alça de amostra de 20 µL, acoplado a um computador com software Breeze, versão 3.2 (Waters Breeze System). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna de fase reversa Symmetry® C18 (4,6 x 150 mm) com partículas de 5 µm (Waters, Irlanda). As separações dos compostos foram realizadas em modo isocrático e as fases móveis utilizadas foram metanol:H₂O (70:30) a 1,2 mL/min para o extrato de gengibre e acetonitrila:H₂O:H₃PO₄ (65,5:34,9:0,02) a 1,5 mL/min para o alecrim, ambas à 25 °C. Os cromatogramas obtidos foram processados a 230 e 282 nm para os extratos de alecrim e gengibre, respectivamente.

A concentração de ácido carnósico (CA) nos extratos de alecrim foi determinada a partir de uma curva de calibração do padrão externo em uma faixa de 0 a 0,1 mg/mL. Todas as análises foram realizadas no mínimo em duplicata.

Concentração de fenóis totais dos extratos ativos

A análise dos teores fenólicos totais dos extratos ativos foi realizada por método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, a partir da metodologia descrita por Kim e colaboradores.⁵⁴ Inicialmente, uma alíquota de 9 mL de água destilada foi adicionada a um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, 1 mL de amostra e 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados ao balão. Após 5 min, foram adicionados 10 mL de uma solução de Na₂CO₃ a 7%, completou-se o volume com água destilada e após 90 min de reação no escuro, à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 765 nm. Uma curva de calibração de ácido gálico como padrão externo foi obtida nas mesmas condições e os resultados foram expressos em mg de fenólicos totais como equivalente de ácido gálico por g do extrato (mg AG/g) (EAG). As análises foram realizadas no mínimo em triplicata.

Avaliação da atividade antioxidante por reação *in vitro* com o radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante dos extratos ativos foi também avaliada através da atividade redutora frente ao radical ABTS^{•+}, o cátion do ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico), a partir da metodologia descrita por Re e colaboradores.⁵⁵ O radical ABTS^{•+} foi obtido pela reação de ABTS (7 mM, concentração final) com persulfato de potássio (2,45 mM, concentração final) após um período de 12 a 16 h a temperatura ambiente, no escuro. O radical formado foi diluído com etanol até absorbância de 0,7 (±0,02) a 734 nm. Em

2 mL do radical ABTS^{•+}, previamente diluído, adicionou-se 20 µL de extrato, dissolvido em etanol, e a solução foi sonicada por 30 s. Após 10 min de reação no escuro, foi efetuada a leitura da absorbância (750 nm). A atividade das amostras foi determinada através de uma curva de calibração obtida com o antioxidante sintético de referência, Trolox (análogo à vitamina E), analisado nas mesmas condições. Os resultados obtidos, no mínimo em triplicata, foram expressos como capacidade antioxidante dos extratos equivalente à do Trolox (CAET).

Avaliação da atividade antioxidante por reação *in vitro* com o radical DPPH[•]

A metodologia para avaliação do potencial antioxidante desenvolvida por Brand-Willians e colaboradores⁵⁶ baseia-se na redução da absorbância do radical DPPH[•] (2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo) a 515 nm pela ação de compostos redutores de radicais livres. Diferentes alíquotas dos extratos ativos dissolvidos em etanol, com concentração de 2,46 e 3,14 mg/mL, para gengibre e alecrim, respectivamente, foram adicionadas a 3 mL de uma solução metanólica de DPPH[•] a 6.10⁻⁵ mol/L. As amostras foram sonicadas por 30 s e após 30 min de reação no escuro foram realizadas as leituras de absorbância. Os resultados obtidos, no mínimo em triplicata, foram expressos como capacidade antioxidante dos extratos equivalente à do Trolox (CAET) e através do valor EC₅₀, definido como a quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH[•] em 50%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha da matéria prima vegetal com certificação orgânica visou a obtenção de extratos ativos isentos de resíduos agrotóxicos, com uma qualidade superior aos produtos obtidos a partir de fontes não orgânicas ou convencionais e com maior potencial industrial, principalmente nas áreas farmacêuticas e biotecnológicas.

Os resultados da extração supercrítica dos extratos de alecrim e gengibre (Tabela 1) mostram que houve um maior rendimento mássico para o extrato de alecrim do Paraná, seguido do extrato de alecrim de São Paulo e por último, o extrato de gengibre. Geralmente os valores de rendimento de extratos destes tipos de plantas variam de 2 a 4%, chegando a valores de até aproximadamente 5% em processos realizados em condições mais drásticas de pressão e temperatura.⁵³ Os valores obtidos para as extrações de alecrim mostram concordância com os valores reportados por Carvalho e colaboradores,⁵³ de aproximadamente 3%, nas mesmas condições testadas neste trabalho. Apesar do rendimento mássico de gengibre ter sido menor, este valor foi similar aos obtidos por Zancan e colaboradores⁵² (1,93 a 2,65%) no estudo em que avaliaram a influência das condições da extração no rendimento mássico final de extratos desta planta.

Tabela 1. Resultados dos processos de obtenção dos extratos ativos de alecrim e gengibre por tecnologia de fluido supercrítico

Material Vegetal	Massa (g)	Densidade Aparente (g/L)	Rendimento Mássico (%)
Gengibre	191,32	637,73	2,4
Alecrim (Paraná)	104,97	349,90	3,4
Alecrim (São Paulo)	102,53	341,77	2,9

Os extratos de alecrim e gengibre obtidos por extração supercrítica foram primeiramente caracterizados por CG-EM, com o objetivo de identificar principalmente a presença de 6-gingerol no extrato de gengibre e de ácido carnósico nos extratos de alecrim. Os resultados dos cromatogramas obtidos para cada amostra são apresentados nas Figuras 1S, 2S e 3S do Material Suplementar.

A análise do extrato de gengibre (Figura 1S) foi dificultada pela indisponibilidade do padrão de 6-gingerol, entretanto, um pico com tempo de retenção de aproximadamente 15,6 min correspondeu a um íon a m/z 294 e a análise das prováveis fragmentações do íon mostra a presença de 90% dos possíveis fragmentos que poderiam ser obtidos para este composto. Quando comparados os cromatogramas obtidos por CLAE para o extrato de gengibre (Figura 3) com os resultados das análises cromatográficas do trabalho desenvolvido por Balladin e colaboradores,⁵⁷ verifica-se que houve correspondência entre o tempo de retenção relatado para o composto 6-gingerol e o obtido neste trabalho. Os autores reportaram um tempo de retenção para a análise do composto 6-gingerol de 4 min, discretamente superior ao tempo de retenção aqui determinado (3,9 min). A partir da análise das áreas dos picos, pode-se concluir que a concentração do composto 6-gingerol no extrato de gengibre produzido corresponde a aproximadamente 46% da área total dos picos referentes à diversidade de compostos do extrato, detectados a 282 nm.

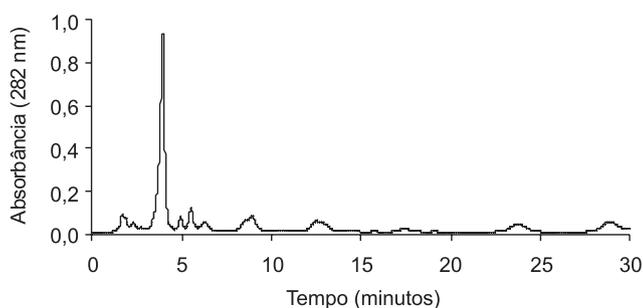


Figura 3. Perfil cromatográfico obtido para o extrato de gengibre pela análise por CLAE

Para as análises dos extratos de alecrim, uma comparação dos correspondentes cromatogramas e seus espectros de massa com o padrão de ácido carnósico sugeriu a presença deste composto antioxidante em ambos os extratos, uma vez que frações com tempo de retenção de 40 min e íon molecular a m/z 332 foram observadas nos cromatogramas obtidos para ambos os extratos. Além disso, a presença deste composto antioxidante foi confirmada também por CLAE. Os cromatogramas obtidos para os extratos ativos de alecrim do Paraná e de São Paulo por esta metodologia são mostrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Os resultados das análises mostraram que os extratos obtidos de alecrim estão constituídos por $23,21 \pm 0,54$ e $44,94 \pm 0,47$ mg de ácido carnósico por grama de amostra, para os extratos do Paraná e de São Paulo, respectivamente, sendo que este último apresenta quase o dobro da concentração de ácido carnósico apresentada pelo extrato do Paraná.

Similarmente ao que ocorre com outras plantas, a composição e

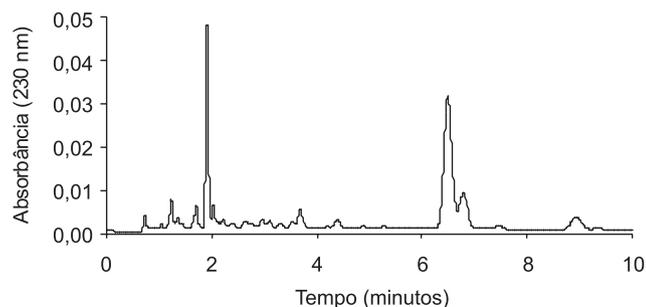


Figura 4. Perfil cromatográfico obtido para o extrato de alecrim do Paraná pela análise por CLAE

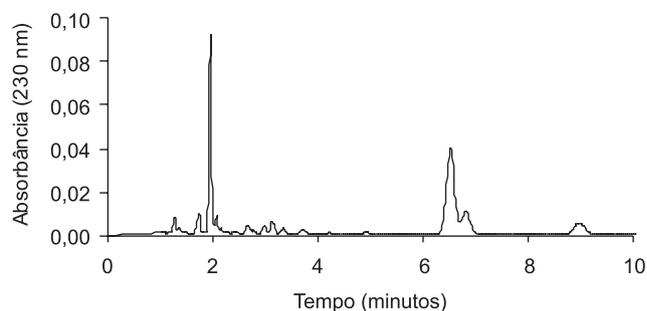


Figura 5. Perfil cromatográfico obtido para o extrato de alecrim de São Paulo pela análise por CLAE

concentração de princípios ativos dos extratos de alecrim pode apresentar grandes diferenças segundo sua origem, espécie, variedade, controle genético, fase de desenvolvimento durante a colheita, estímulos proporcionados pelo meio como, por exemplo, fatores climáticos, edáficos (relacionados com o solo), exposição a microrganismos, insetos e outros herbívoros, poluentes e tipo de processamento pós-colheita. Dentre os fatores climáticos, destacam-se o fotoperíodo (número de horas de luz por dia), a temperatura e o estresse hídrico (deficiência de água no solo). Todas estas características fornecem propriedades organolépticas características como pungência e amargor, de maneira particular a cada planta aromática, podendo determinar em algumas espécies a concentração de determinado princípio ativo, o que dificulta generalizar os resultados referentes à composição destes tipos de materiais.⁵⁸⁻⁶⁰

No estudo realizado por Petersen e Simmonds⁶¹ comprovou-se que a concentração do ácido rosmarínico no alecrim pode estar relacionada com os mecanismos de defesa da planta, principalmente contra patógenos e herbívoros.

Celiktas e colaboradores⁶² obtiveram valores de concentração de ácido carnósico de 5,0 a 115,5 mg/g de extrato dependendo da região e da época do ano em que as amostras de alecrim foram coletadas. Segundo os autores, meses frios não favorecem o acúmulo deste ácido. Estes fatos podem ter influenciado a concentração de ácido carnósico no extrato do Paraná.

As variações na concentração do ácido carnósico também podem ter sido influenciadas por outros fatores, como a temperatura de secagem do material vegetal. O material vegetal de São Paulo, obtido ainda fresco, foi seco à temperatura ambiente, diferentemente do material obtido do Paraná, que foi seco em forno a 40 °C no Instituto produtor do mesmo. Poucos estudos têm sido realizados a respeito dos efeitos do processo de secagem na qualidade e quantidade de extratos de plantas.⁶³ No estudo realizado por Medsen e Bertelsen,⁷ o aquecimento do material vegetal resultou na redução da atividade antioxidante da maioria dos extratos ativos devido, principalmente, às reações dos compostos fenólicos com outras substâncias. No estudo realizado por Jaganmoham e colaboradores,⁶⁴ o processo de secagem de alecrim a 45 °C resultou na perda de 7,25% dos compostos voláteis.

Thorsen e Hildebrandt²⁴ relataram que a qualidade como antioxidante e os preços de extratos comerciais de alecrim estão altamente relacionados com a concentração, primeiramente, de ácido carnósico e, em segundo lugar, com o conteúdo total de compostos fenólicos. Contudo, no extrato comercial de alecrim Herbor (P31) comercializado pela companhia FIS S.A. (Chatel-St-Denis, Suíça), foi encontrado 2,2% de ácido carnósico.⁶⁵ Com base nestes resultados, os extratos de alecrim aqui analisados, contendo 2,3 e 4,5% de ácido carnósico quando provenientes dos estados do Paraná e de São Paulo, respectivamente, apresentariam, potencialmente, um alto valor comercial do ponto de vista da sua atividade biológica.

Alguns estudos têm indicado que a capacidade antioxidante de

óleos voláteis e de extratos orgânicos de plantas está diretamente relacionada com o conteúdo total de compostos fenólicos deste tipo de amostra.⁶⁶

As concentrações de compostos fenólicos totais dos extratos, determinadas usando o reagente de Folin-Ciocalteu, estão apresentadas na Figura 6. Os resultados demonstram a presença de altas concentrações de compostos fenólicos totais nos três extratos orgânicos, variando de 54,60 a 136,07 mg AG (equivalente em ácido gálico) por grama de amostra. Diferenças entre os valores de fenóis totais foram observadas para os três extratos ativos, inclusive entre os dois extratos da mesma planta (alecrim), mas de diferentes origens. O maior conteúdo em compostos fenólicos totais foi determinado para o extrato ativo de gengibre.

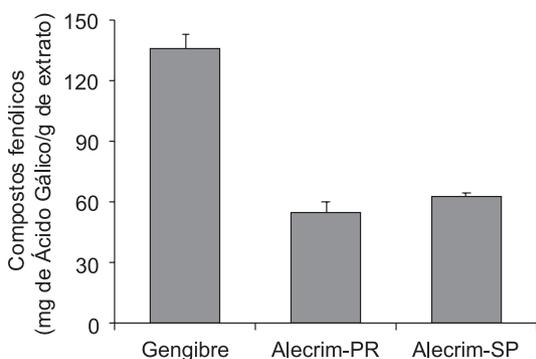


Figura 6. Concentração de compostos fenólicos totais nos extratos orgânicos. Resultados: Média \pm DP

Chanwitheesuk e colaboradores⁶⁷ investigaram o conteúdo de compostos fenólicos totais de extratos metanólicos de gengibre. De acordo com seus resultados, os extratos apresentaram 0,601 mg AG/g, inferiores aos valores aqui obtidos para o extrato de gengibre. Os altos índices de compostos fenólicos encontrados nos extratos e relatados no presente estudo podem estar relacionados à metodologia de extração empregada, considerando que a escolha da mesma visou a otimização da extração e recuperação dos principais compostos fenólicos nos extratos ativos.

Mata e colaboradores⁶⁸ obtiveram valores de concentração de compostos fenólicos em extratos aquosos e etanólicos de alecrim de cerca de 58,4 e 73,5 mg AG/g, respectivamente, resultados similares aos relatados neste trabalho. Valores superiores foram obtidos por Celiktas e colaboradores,⁶² de 34,1 a 119 mg AG/g de extrato obtidos por extração supercrítica, dependendo da região geográfica e da época de colheita do material fresco.

As atividades antioxidantes dos extratos ativos obtidos foram determinadas através das curvas de calibração obtidas para o antioxidante sintético Trolox, em uma faixa de concentração de 0 a 15 μ M (concentração final) para o radical ABTS^{•+} e de 3 a 15 μ M para o radical DPPH[•]. Uma comparação entre as duas metodologias avaliadas mostra que o radical ABTS^{•+} é mais sensível à presença de compostos antioxidantes e, desta forma, a porcentagem da inibição neste sistema é maior quando comparada com a inibição do radical DPPH[•] nas mesmas concentrações. Apesar de ser uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de compostos redutores e de ser aplicável a sistemas hidrofílicos e lipofílicos,⁶⁹ este método mostra uma baixa seletividade do radical na reação com compostos doadores de hidrogênio.⁷⁰

Os valores de atividade antioxidante dos extratos ativos de alecrim e gengibre mostram a alta capacidade destes extratos de sequestrar os radicais livres testados. Em relação ao radical ABTS^{•+} os extratos mostraram valores de CAET (mM/g) de $190,96 \pm 13,35$; $231,51 \pm 11,90$ e $352,47 \pm 28,21$ para os extratos de alecrim do Paraná, de alecrim de São Paulo e de gengibre, respectivamente. Estes valores

foram correspondentes aos obtidos pela redução do radical DPPH[•], sistema no qual foram obtidos valores de CAET (mM/g) de $78,65 \pm 2,18$; $86,23 \pm 0,96$ e $143,87 \pm 8,71$ para o extrato de alecrim do Paraná, de alecrim de São Paulo e de gengibre, respectivamente. Estes resultados podem ser visualizados através da Figura 7.

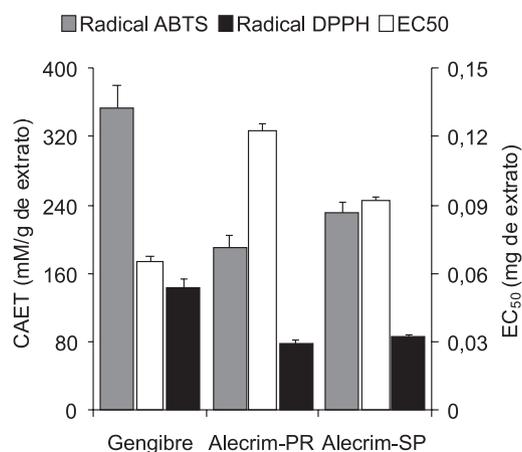


Figura 7. Capacidade antioxidante dos extratos ativos de alecrim e gengibre, expressos como CAET (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) e coeficientes de eficiência EC₅₀. Resultados: Média \pm DP

Quando analisados os resultados, expressos como CAET, das análises realizadas em ambos os ensaios, verifica-se que o extrato ativo de gengibre apresentou a maior capacidade antioxidante, enquanto o extrato de alecrim do estado de Paraná foi o que mostrou menor atividade redutora. Provavelmente este resultado esteja relacionado com o maior conteúdo de compostos fenólicos neste tipo de extrato, como discutido anteriormente. Zheng e Wang⁷¹ destacaram também que, devido à diversidade e complexidade das misturas naturais de compostos fenólicos nos extratos herbáceos, é difícil a caracterização e comparação de suas atividades antioxidantes.

A partir da curva de calibração obtida por regressão linear dos valores de concentração do radical DPPH[•] e de suas absorvâncias a 515 nm, foram determinadas as porcentagens do radical remanescente nas reações para várias concentrações de extratos ativos e os coeficientes de eficiência EC₅₀ (mg de extrato), definido como a quantidade necessária de extrato ativo para que a concentração inicial do radical DPPH[•] na reação diminua em 50%.

Os valores obtidos para os coeficientes de eficiência EC₅₀ dos extratos de alecrim e gengibre são mostrados na Figura 7. Considerando-se que quanto menor é o valor de EC₅₀, maior é a capacidade antioxidante do material analisado, os resultados indicam novamente o extrato de gengibre como o material com maior poder antioxidante. O maior valor de EC₅₀ foi obtido para o extrato ativo de alecrim do Paraná.

Os valores de CAET e EC₅₀ geralmente são considerados parâmetros referentes à qualidade e reatividade dos extratos de plantas, respectivamente, representando a quantidade de compostos redutores de radicais livres presentes em cada amostra. Além disto, a capacidade antioxidante pode estar também relacionada com a velocidade da reação redutora dos compostos. Desta forma, extratos com valores próximos ou iguais de CAET e EC₅₀ podem ter valores de constantes cinéticas diferentes, mostrando diferentes modos de ação (rápidos ou lentos).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que a metodologia de extração por fluido supercrítico (EFSC) permite obter extratos ativos com altos níveis de concentração de compostos fenólicos e de compostos capazes

de reduzir radicais livres. Os extratos de alecrim e gengibre obtidos mostraram, através de ensaios *in vitro*, alta atividade antioxidante, o que demonstra um grande potencial para atingir alto valor comercial do ponto de vista da sua atividade biológica.

Dentre os extratos orgânicos obtidos, o extrato ativo de gengibre apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais e, conseqüentemente, a maior atividade antioxidante. A adição destes extratos ativos pode evitar a deterioração oxidativa em vários sistemas através da redução de radicais livres neles presentes, mostrando-se agentes antioxidantes com alto potencial para serem utilizados inclusive como substitutos de antioxidantes sintéticos nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As Figuras 1S, 2S e 3S estão disponíveis, como material suplementar, em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso gratuito.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- OMS-World Health Organization; *WHO Policy Perspectives on Medicine* **2002**, 2, 1.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022.
- Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J.; *Anticancer Agents from Natural Products*, Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2005.
- Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3954.
- Dorman, H. J. D.; Peltoketo, A.; Hiltunen, R.; Tikkanen M. J.; *Food Chem.* **2003**, 83, 255.
- Stefanovits-Bányai, E.; Tulok, M. H.; Hegedús, A.; Renner, C.; Varga, I. S.; *Acta Biologica Szegediensis* **2003**, 47, 111.
- Medsen, H. L.; Bertelsen, G.; *Trends Food Sci. Technol.* **1995**, 6, 271.
- Soliman, F. M.; El-Kashory, E. A.; Fathy, M. M.; Gonaïd, M. H.; *Flavour Frag. J.* **1994**, 9, 29.
- Rezzoug, S. A.; Boutekdjiret, C.; Allaf, K.; *J. Food Eng.* **2005**, 71, 9.
- Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C. S.; Vojnov, A. A.; *Free Radical Res.* **2006**, 40, 223.
- Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T.; *Braz. J. Food Technol.* **2006**, 9, 209.
- Youn, J.; Lee, K. H.; Won, J.; Huh, S. J.; Yun, H. S.; Cho, W. G.; Paik, D. J.; *J. Rheumatol.* **2003**, 30, 1203.
- Sanbongi, C.; Takano, H.; Osakabe, N.; Sasa, N.; Natsume, M.; Yanagisawa, R.; Inoue, K.; Kato, Y.; Osawa, T.; Yoshikawa, T.; *Free Radical Biol. Med.* **2003**, 34, 1060.
- Visanji, J. M.; Thompson, D. G.; Padfield, P. J.; *Cancer Lett.* **2006**, 237, 130.
- Huang, S.; Zheng, R.; *Cancer Lett.* **2006**, 239, 271.
- Kosaka, K.; Yokoi, T.; *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, 26, 1620.
- Huang, M.; Ho, C.; Wang, Z. Y.; Ferraro, F.; Lou, Y.; Stauber, K.; Ma, W.; Georgiadis, C.; Laskin, J. D.; Conney, A. J.; *Cancer Res.* **1994**, 54, 701.
- Pearson, D. A.; Frankel, E. N.; Aeschbach, R.; German, B.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 578.
- Saito, Y.; Shiga, A.; Yoshida, Y.; Furuhashi, T.; Fujita, Y.; Niki, E.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2004**, 68, 781.
- Peng, Y.; Yuan, J.; Liu, F.; Ye, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39, 431.
- Jayaprakasha, G. K.; Negi, P. S.; Jena, B. S.; Rao, L. J. M.; *J. Food Compos. Anal.* **2007**, 20, 330.
- Özkan, G.; Kuleaşan, H.; Çelik, S.; Göktürk, R. S.; Ünal, O.; *Food Control* **2007**, 18, 509.
- Backleh, M.; Leupold, G.; Parlar, H.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1297.
- Thorsen, M. A.; Hildebrandt, K. S.; *J. Chromatogr., A* **2003**, 995, 119.
- Elpo, E. R. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2004.
- Wang, C. C.; Chen, L. G.; Lee, L. T.; Yang, L. L.; *In Vivo* **2003**, 17, 641.
- Hawllader, M. N. A.; Perera, C.; Tian, M.; *Dry. Technol.* **2006**, 24, 51.
- Pfeiffer, E.; Heuschmid, F. F.; Kranz, S.; Metzler, M. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8769.
- Wei, Q.-Y.; Ma, J.-P.; Cai, Y.-J.; Yang, L.; Liu, Z.-L.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 102, 177.
- Padma, V. V.; Christie, S. A. D.; Ramkuma, K. M.; *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, 100, 302.
- Surh, Y. J.; Lee, E.; Lee, J. M.; *Mutat. Res.* **1998**, 402, 259.
- Surh, Y. J.; *Food Chem. Toxicol.* **2000**, 40, 1091.
- Bode, A. M.; Ma, W. Y.; Surh, Y. J.; Dong, Z.; *Cancer Res.* **2001**, 61, 850.
- Chung, W. Y.; Jung, Y. J.; Surh, Y. J.; Lee, S. S.; Park, K. K.; *Mutat. Res.* **2001**, 496, 199.
- Keum, Y. S.; Kim, J.; Lee, K. H.; Park, K. K.; Surh, Y. J.; Lee, J. M.; Lee, S. S.; Yoon, J. H.; Joo, S. Y.; Cha, I. H.; Yook, J. I.; *Cancer Lett.* **2002**, 177, 41.
- Surh, Y. J.; *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 768.
- Leal, P. F.; Braga, M. E. M.; Sato, D. N.; Carvalho, J. E.; Marques, M. O. M.; Meireles, M. A. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2520.
- Miyoshi, N.; Nakamura, Y.; Ueda, Y.; Abe, M.; Ozawa, Y.; Uchida, K.; Osawa, T.; *Cancer Lett.* **2003**, 199, 113.
- Morrison, D.; *Dietary ginger may work against cancer growth*, University of Minnesota Press: Minneapolis, 2003.
- Jiang, H.; Solyom, A. M.; Timmermann, B. N.; Gang, D. R.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 2957.
- Afzal, M.; Al-Hadidi, D.; Menon, M.; Pesek, J.; Dhami, M. S.; *Drug Metab. Drug Interact.* **2001**, 18, 159.
- Tjendraputra, E.; Tran, V. H.; Liu-Brennan, D.; Roufogalis, B. D.; Duke, C. C.; *Bioorg. Chem.* **2001**, 29, 156.
- Thomson, M.; Al-Qattan, K. K.; Al-Sawan, S. M.; Alnaqeeb, M. A.; Khan, I.; Ali, M.; *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **2002**, 67, 475.
- Ficker, C.; Smith, M. L.; Akpagana, K.; Gbeassor, M.; Zhang, J.; Durst, T.; Assabgui, R.; Arnason, J. T.; *Phytother. Res.* **2003**, 17, 897.
- Ippoushi, K.; Azuma, K.; Ito, H.; Horie, H.; Higashio, H.; *Life Sci.* **2003**, 73, 3427.
- Kim, D. S. H. L.; Kim, J. Y.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1287.
- Rai, S.; Mukherjee, K.; Mal, M.; Wahile, A.; Saha, B. P.; Mukherjee, P. K.; *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 2292.
- Habsah, M.; Amran, M.; Mackeen, M. M.; Lajis, N. H.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N.; Rahman, A. A.; Ghafar, A. M.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, 72, 403.
- Dedov, V. N.; Tran, V. H.; Duke, C. C.; Connor, M.; Christie, M. J.; Mandadi, S.; Roufogalis, B. D.; *Br. J. Pharmacol.* **2002**, 137, 793.
- Lantz, R. C.; Chen, G. J.; Sarihan, M.; Solyom, A. M.; Jolad, S. D.; Timmermann, B. N.; *Phytomedicine* **2007**, 14, 123.
- Balachandran, S.; Kentish, S. E.; Mawson, R.; *Sep. Purif. Technol.* **2006**, 48, 94.
- Zancan, K. C.; Marques, M. O. M.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A.;

- J. Supercrit. Fluids* **2002**, 24, 57.
53. Carvalho, R. N.; Moura, L. S.; Rosa, P. T. V.; Meireles, M. A. M.; *J. Supercrit. Fluids* **2005**, 35, 197.
54. Kim, D.; Chun, O. K.; Kim, Y. J.; Moon, H.; Lee, C. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6509.
55. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, K.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26, 1231.
56. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, 28, 25.
57. Balladin, D. A.; Headley, O.; Chang-Yen, I.; Mcgaw, D. R.; *Renew. Energ.* **1998**, 13, 531.
58. Guillén, M. D.; Cabo, N.; Burillo, J.; *J. Sci. Food Agric.* **1996**, 70, 359.
59. Wellwood, C. R.; Cole, R. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 6101.
60. Troncoso, N.; Sierra, H.; Carvajal, L.; Delpiano, P.; Günther, G.; *J. Chromatogr. A* **2005**, 1100, 20.
61. Petersen, M.; Simmonds, M. S. J.; *Phytochemistry* **2003**, 62, 121.
62. Celiktas, O. Y.; Bedir, E.; Sunkan, F. V.; *Food Chem.* **2007**, 101, 1457.
63. Díaz-Maroto, M. C.; Viñas, M. A. G.; Cabezudo, M. D.; *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, 216, 227.
64. Jaganmohan, R. L.; Singh, M.; Raghavan, B.; Abraham, K. O.; *J. Food Quality* **1998**, 21, 107.
65. Samman, S.; Sandström, B.; Toft, M. B.; Bukhave, K.; Jensen, M.; Sørensen, S. S.; Hansen, M.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 73, 607.
66. Stefanovits-Banyai, E.; Szentmihályi, K.; Hegedüs, A.; Koczka, N.; Vali, L.; Taba, G.; Blazovics, A.; *Life Sci.* **2006**, 78, 1049.
67. Chanwitheesuk, A.; Theerawutgulung, A.; Rakhariyatham, N.; *Food Chem.* **2005**, 92, 491.
68. Mata, A. T.; Proença, C.; Ferreira, A. R.; Serralheiro, M. L. M.; Nogueira, J. M. F.; Araújo, M. E. M.; *Food Chem.* **2007**, 103, 778.
69. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26, 1231.
70. Arts, M. J.; Haenen, G. R.; Voss, H. P.; Bast, A.; *Food Chem. Toxicol.* **2004**, 42, 45.
71. Zheng, W.; Wang, S. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 5165.